FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 5

L'ISOLEMENT DU BACILLE TUBERCULEUX A PARTIR DES PRODUITS PATHOLOGIQUES SURINFECTÉS

THÈSE

présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté de Médecine Générale
et Coloniale et de Pharmacie de Marseille
le 21 Juin 1955

par

Jean AUDRIN

né le 13 Août 1928 à Digne (Basses-Alpes)

PHARMACIEN

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse : MM. BRAHIC, PELLISSIER, GREBUS, TISON

Imprimerie PLANCHER, Bonneville (Haute-Savoie)

[1955]

L'ISOLEMENT DU BACILLE TUBERCULEUX A PARTIR DES PRODUITS PATHOLOGIQUES SURINFECTÉS

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N°

L'ISOLEMENT DU BACILLE TUBERCULEUX A PARTIR DES PRODUITS PATHOLOGIQUES SURINFECTÉS

THÈSE

présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté de Médecine Générale
et Coloniale et de Pharmacie de Marseille
le 21 Juin 1955

par

Jean AUDRIN

né le 13 Août 1928 à Digne (Basses-Alpes)

PHARMACIEN

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse : MM. BRAHIC, PELLISSIER, GREBUS, TISON

Imprimerie PLANCHER, Bonneville (Haute-Savoie)

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen : G. MORIN. *Assesseur :* J. DELPHAUT.

Doyen honoraire : L. IMBERT.

Professeurs honoraires : MM. AUBARET, AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, GABRIEL, HECKENROTH, JOYEUX, OLMER, RIMATTEI, ROCHE, ROGER.

Chargé de cours honoraire : M. TIAN.

Secrétaire principal : J. COMTE. *Bibliothécaire :* Mlle PERRIN.

PROFESSEURS

Anatomie	GRISOLI
Anatomie Pathologique	GASTAUT
Bactériologie et Pathologie Générale	BRAHIC
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie Clinique et Expérimentale	JOUVE
Chimie Médicale	DERRIEN
Chimie Analytique et Hydrologie	ARNOUX
Chimie	DUMAZERT
Clinique Chirurgicale	FIOLLE
Clinique Chirurgicale	MOIROUD
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédie	SALMON
Clinique Chirurgicile et Thérapeutique et Chirurgie Expérimentale	DE VERNEJOUL
Clinique Dermato-Syphiligraphique	CHARPY
Clinique Exotique	BLANC
Clinique des Maladies du Système Nerveux	POURSINES
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique Médicale	POINSO
Clinique Médicale Thérapeutique	OLMER J.
Clinique des Maladies des Voies Digestives et de la Nutrition	N...
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologique	CHOSSON
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Urologique	CHAUVIN
Histologie	PICARD
Hygiène et Médecine Préventive	SAUTET
Matière Médicale	BALANSARD
Médecine Légale et Médecine du Travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie Chirurgicale	CARCASSONNE
Pathologie Interne	AUDIER
Pharmacologie	MERCIER
Pharmacie Chimique et Toxicologie	VIGNOLI
Pharmacie Galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physique Médicale	DUBOULOZ
Thérapeutique	PIERI
Professeur sans chaire	ROUX

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

MM. BOURRET
DONNET
GREBUS
MERCIER Jacques
MOURGUE
LISSITSKY

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. APPAIX
BERNARD
CREMIEUX
GRANJON
HENRY
LAMY
LAVAL
LENA
MARONNEAUD
MONGES H.
OLLIVIER
OURGAUD
PAOLI
RAYBAUD
SERMENT
VAGUE

AGRÉGÉS LIBRES

MM. BERTHIER
DOR
FIGARELLA
IMBERT
RECORDIER

Chargés des fonctions de Maîtres de Conférences

Anatomie Pathologique ..... M. PAYAN
Botanique et Cryptogamie ..... M. BERNARD P.
Histologie ..... M. STAHL

Chargé des fonctions d'Agrégés

Clinique Urologique ..... M. CHAUVIN

A MES PARENTS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BRAHIC

Nous le remercions du grand honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider cette thèse.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PELLISSIER

qui nous avait accueilli dans son laboratoire.
Qu'il nous soit permis de lui adresser nos biens vifs sentiments de gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ GRÉBUS

Que ce modeste travail soit le gage de notre respectueux attachement et de notre profonde reconnaissance.

A MONSIEUR LE DOCTEUR TISON

Médecin-Directeur du Village Sanatorium de PRAZ-COUTANT

qui a inspiré et dirigé ce travail. Qu'il veuille trouver ici l'assurance de notre vive gratitude.
Nous sommes heureux de le compter parmi nos juges.

A MONSIEUR LE DOCTEUR P.-E. DAVY

Ancien Président de la Société de la Tuberculose
Ancien Médecin-Directeur du Village Sanatorium de PRAZ-COUTANT

avec notre grande admiration pour l'œuvre qu'il a accomplie.

A MONSIEUR LE DOCTEUR J.-C. LEVADITI

Chef du Service d'Anatomie Pathologique à l'Institut Pasteur

Nous l'assurons de notre profond attachement pour la bienveillance qu'il nous a montrée.

A MONSIEUR LE DOCTEUR GUICHENÉ

Médecin-Directeur du Village Sanatorium de GUÉBRIANT

A MONSIEUR LE DOCTEUR LOWYS

Médecin-Directeur du Village Sanatorium LE ROC DES FIZ

A MONSIEUR LE DOCTEUR RAUTUREAU

Médecin-Directeur du Village Sanatorium MARTEL-DE-JANVILLE

Nous les remercions pour les preuves de confiance qu'ils nous donnent.

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ MIXTE
DE MÉDECINE ET PHARMACIE DE MARSEILLE

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 13

CHAPITRE I. — *Influence des germes de surinfection sur l'intégrité du bacille de Koch au cours du transport du prélèvement* 19

CHAPITRE II. — *L'inoculation au cobaye* 23

— Les méthodes de purification primitives 24

— Les méthodes utilisant des moyens chimiques ... 24

— Emploi des sulfamides 26

— Emploi de la pénicilline 27

— Emploi de l'auréomycine 28

CHAPITRE III. — *Etude et critique des méthodes d'isolement du bacille tuberculeux en vue de la culture* 31

— Historique 31

— Comparaison des méthodes 34

CHAPITRE V. — *Etude systématique des différents facteurs en sodique dilué* 39

— Les tensio-actifs 39

— Etude de l'action destructrice sur les germes banaux 41

— Etude de l'action sur le bacille de Koch 43

— Etude du pouvoir homogénéisant 45

CHADITRE V. — *Etude systématique des différents facteurs en jeu dans la méthode au Teepol* 49

— Action du Teepol-soude pendant 1/2 heure 49

— Facteurs qui interviennent au cours de la neuralisation et après l'ensemencement 50

— Comparaison avec la méthode à la soude 54

CONCLUSIONS 57

BIBLIOGRAPHIE 61

INTRODUCTION

Si la connaissance radiologique des lésions pulmonaires est un des éléments prédominants dans le diagnostic et le traitement de la tuberculose pulmonaire, elle ne peut être dissociée pour le phtisiologue de la recherche du bacille tuberculeux. Seule la preuve bactériologique permet d'affirmer, de signer le diagnostic de tuberculose, d'éliminer les faux tuberculeux et d'affirmer la guérison.

Au cours du traitement, la surveillance bactériologique a toute son importance, la présence ou l'absence de bacilles peut ou non inciter le médecin à tenter une intervention chirurgicale : extra-pleural, exérèse...

Plus tard, les examens de laboratoire devront être multipliés pour contrôler les signes de guérison.

Mais la mise en évidence de bacille tuberculeux est un problème particulier de la bactériologie et présente un certain nombre de difficultés.

Dans le simple fait du prélèvement, des causes d'erreurs peuvent déjà fausser le résultat : la valeur des examens dépend d'abord de la manière dont sont choisis et prélevés les produits pathologiques.

Les sécrétions bronchiques sont en principe émises à l'extérieur sous forme de crachats purulents. Ces expectorations se produisent d'une manière intermittente, souvent au réveil, parfois en cours de journée. Il faut donc choisir le crachat, être sûr que celui que l'on examine est bien de provenance bronchique. Ce choix a autant d'importance que celui de la technique qui sera mise en œuvre ultérieurement.

Certains malades ne savent pas expectorer leurs sécrétions bronchiques en crachant, entre autres les enfants. Ils les déglutissent et on retrouve les crachats dans le liquide gastrique. Le mérite d'aller chercher le crachat où il se trouve, en procédant à des lavages gastriques, revient à MEUNIER et ARMAND DELILLE.

Ce prélèvement simple et facile doit tout de même être fait avec certaines précautions : les crachats s'accumulent dans l'estomac sans être évacués au cours du repos de la nuit. On procèdera au lavage gastrique le matin à jeûn ; il faut éviter que le malade ne fasse trop de mouvements et surtout qu'il ne voyage avant le prélèvement.

Chez les enfants, P. LOWYS (1) a montré l'intérêt du prélèvement laryngé. Il introduit un écouvillon courbe entre les cordes vocales, sous contrôle du miroir laryngé. Le réflexe de toux qui en résulte évacue les sécrétions qui sont recueillies sur un écouvillon.

Chez les malades qui crachent peu, on peut procéder à une expectoration provoquée : un aérosol de sérum physiologique crée une expectoration forcée. Les crachats ainsi émis sont collectés. Cette méthode est supérieure à l'inondation bronchique que l'on utilise dans le même but et qui est brutale et choquante, donc à éviter chez les tuberculeux.

L'émission des bacilles par les voies de drainage que sont les bronches est essentiellement discontinue. On risque donc de faire des examens sur des échantillons qui ne contiennent pas de bacilles, alors que le malade est bacillaire. Au lieu de faire ainsi des examens successifs sur les prélèvements uniques, on réalise un gain de temps très appréciable en faisant des examens moins nombreux mais sur le mélange des expectorations de plusieurs jours que l'on traite comme un seul échantillon.

La collection des lavages gastriques de quatre jours permet de même un examen de grande valeur. L'ensemble subit une centrifugation et le culot est traité comme un crachat.

La première méthode de rechercher du bacille tuberculeux est l'examen direct des différents produits susceptibles de contenir des bacilles tuberculeux.

Nous n'insisterons pas sur cet examen de routine. Nous ferons simplement remarquer son manque de sensibilité et de précision : CORPER (2) a montré qu'il fallait environ 100.000 bacilles tuberculeux par centimètre cube de crachat pour que l'on puisse en retrouver quelques-uns sur une lame. Cet examen n'est donc valable que lorsqu'il s'applique à des malades très fortement bacillaires.

Quand il est négatif, cela ne signifie pas forcément qu'il n'y a pas de bacilles tuberculeux, mais peut-être qu'ils sont en plus petit

nombre et pour les mettre en évidence on aura recours à des méthodes plus sensibles : *l'inoculation* et la *culture* qui, de plus, permettent de différencier le bacille tuberculeux de certains bacilles acido-résistants saprophytes avec lesquels il est facile de le confondre.

Quand l'examen direct est positif on peut avoir besoin de recourir à l'inoculation et à la culture pour étudier les caractéristiques du germe, sa virulence, sa vitalité, sa résistance aux différents antibiotiques...

Lorsque le bacille tuberculeux est le seul germe existant dans le produit étudié, on n'aura simplement qu'à ensemencer ou inoculer sans traitement préalable, sauf dans le cas de certains pus, où la présence de facteurs empêchants oblige à une dilution du produit (3).

Dans les expectorations bronchiques le bacille tuberculeux est toujours associé à des germes banaux et saprophytes dont il faudra se débarrasser sans nuire à la viabilité des bacilles tuberculeux que l'on cherche à mettre en évidence.

On trouve dans les crachats et tubages gastriques des germes d'infection secondaire qui se rencontrent à l'état normal dans la cavité bucco-pharyngée : staphylocoques, streptocoques, pneumocoques, entérocoques, miccrococcus, tetragenes, neisseria catharrhalis, b. de Friedlander...

En plus de ces germes saprophytes on trouve des germes de l'air : sarcines, b. subtilis, des bacilles protéolytiques.

Les crachats contiennent aussi des spores de levures et de champignons (Candida albicans). L'emploi massif des antibiotiques en favorise le développement (4-5).

Citons encore parmi cette flore banale différents germes anaérobies.

La présence de toute cette flore de surinfection est indésirable aussi bien pour la culture que pour l'inoculation. Le but à poursuivre est l'élimination de ces germes pour ne conserver que le bacille tuberculeux dans le produit pathologique étudié.

Le cobaye, comme tout animal, réagit à l'infection et lutte pour éliminer ces germes qu'on lui a inoculés et ainsi il réalise l'isolement du bacille tuberculeux qui a été inoculé en même temps. Mais souvent le cobaye ne résiste pas à cette infection secondaire et il en meurt.

Si l'animal survit, il présente de toutes façons une réaction locale d'inoculation qui, comme nous le verrons plus loin, a un effet retardateur sur la terberculisation.

Il faut donc réaliser l'isolement du bacille tuberculeux avant l'inoculation : détruire les germes banaux sans tuer le bacille tuberculeux et sans que le traitement subi par l'inoculat ait une action néfaste sur le cobaye.

Le problème a été résolu en faisant agir in-vitro des antibiotiques (6).

Ces germes saprophytes ont sur la culture un effet désastreux. Le bacille tuberculeux est un germe très exigeant qui nécessite des milieux très riches. Sur ces milieux, cocci, bacilles et levures cultivent avec une grande vigueur et par leur développement excessif (concurrence vitale), par leur action sur le milieu : acidification, alcalinisation ou destruction complète par protéolyse, ils empêchent la culture de bacille tuberculeux.

Le problème est beaucoup plus difficile à résoudre que dans le cas du cobaye.

En 1913, BEZANÇON disait : « La culture des crachats n'est guère usitée en pratique, la difficulté de l'isolement en première culture du bacille et surtout l'existence dans les crachats de microbes d'infection secondaire à développement plus rapide et plus exubérant que le bacille tuberculeux rendent la technique délicate » (7).

Depuis lors, de nombreuses méthodes ont été préconisées parmi lesquelles certaines n'ont plus qu'un intérêt historique. Mais aucune de celles qui sont employées maintenant ne nous a paru réellement satisfaisante, comme nous le verrons plus loin. Nous avons mis au point au Laboratoire central de Praz-Coutant une nouvelle méthode qui jusqu'à présent nous a donné entière satisfaction.

Nous faisons appel non plus à des moyens chimiques, mais à des moyens physiques.

La présence dans un prélèvement de germes banaux pose encore au laboratoire un autre problème :

Il arrive que le malade ne puisse se déplacer ou que le laboratoire soit assez éloigné : les prélèvements doivent souvent voyager plus ou moins longtemps. D'autre part, dans le cas des examens en série ils séjournent pendant trois ou quatre jours à la température ambiante avant d'être examinés.

Que se passe-t-il dans ces milieux propices à la putréfaction où les germes saprophytes ne demandent qu'à proliférer ? Est-ce que la surinfection qui va en résulter n'aura pas une action sur les caractères morphologiques et vitaux du bacille tuberculeux ?

Autrement dit, quel est le devenir du bacille tuberculeux dans un milieu surinfecté ?

Le plan de notre travail est le suivant :

Dans un premier chapitre, nous étudierons l'action des germes banaux sur le bacille tuberculeux, dans le prélèvement lui-même, et le problème du transport de ce prélèvement. Puis, nous verrons la nécessité de traiter les produits où l'on recherche le bacille de Koch, pour détruire la flore de surinfection. La revue des différentes méthodes de traitement en vue de l'inoculation sera le sujet de notre second chapitre.

Dans le troisième chapitre, nous ferons l'énumération et la critique des méthodes qui ont été proposées pour la culture.

Enfin, dans les quatrième et cinquième chapitres, nous parlerons de nos travaux sur les corps tensio actifs qui nous ont amenés à concevoir une méthode nouvelle pour détruire les germes de surinfection, et de l'application de cette méthode à la culture du bacille tuberculeux.

CHAPITRE PREMIER

Influence des germes de surinfection sur l'intégrité du bacille de Koch au cours du transport du prélèvement

Il n'est pas dans notre sujet de nous étendre sur la question du prélèvement dont nous avons déjà parlé, P.-E. DAVY l'a remarquablement étudiée dans un rapport couronné par l'Académie de Médecine (8).

« L'indifférence ou la négligence dans le choix des produits d'expectoration à diriger sur le laboratoire est une cause fréquente du nombre anormalement élevé des examens négatifs. »

Mais il arrive que des produits positifs à l'examen microscopique — donc provenant de prélèvements bien faits — se révèlent négatifs à la culture et ne tuberculisent pas le cobaye.

C'est ce qui a amené le Laboratoire central de Praz-Coutant à étudier cette question :

Y a-t-il survie du bacille tuberculeux dans un milieu surinfecté ?

Quel est, dans les conditions normales d'expédition au laboratoire son devenir au point de vue morphologique et au point de vue vital ? (9)

1° Les caractères morphologiques et tinctoriaux restent intacts.

En effet, onze crachats positifs ont été conservés (dans des flacons bouchés au caoutchouc utilisés normalement pour l'expédition) pendant trois mois à différentes températures et surveillés tous les cinq jours.

— à + 7° C : les bacilles tuberculeux ne sont pas modifiés et les germes banaux eux-mêmes sont à peine altérés au bout de trois mois.

— à + 22° C : le crachat est lysé lentement mais il n'y a aucune modification des bacilles tuberculeux.

— à + 37° C : la lyse rapide du crachat par liquéfaction accompagnée d'une prolifération des anaérobies laisse le bacille tuberculeux apparemment intact.

Mais ces résultats, s'ils montrent une persistance morphologique du bacille tuberculeux ne prouvent pas que ces bacilles sont encore susceptibles de tuberculiser l'animal et d'être cultivés.

L'idée de vie du bacille ne doit pas forcément être associée à l'idée de reproduction ni à celle de virulence. En d'autres termes, un bacille vivant qui est en général à la fois végétable et virulent peut être non végétable et non virulent ou bien végétable et non virulent.

Les travaux récents sur la bactériologie des pièces d'exérèse ont mis ces faits bien en évidence (10).

2° Ces bacilles que l'on a vus à l'examen microscopique peuvent être des bacilles tuberculeux morts (un bacille tuberculeux mort conserve tous ses caractères morphologiques et se colore normalement).

Des crachats ont donc été conservés dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Des prélèvements successifs en ont été cultivés et inoculés tous les jours pendant dix jours puis tous les dix jours jusqu'au troisième mois.

— A + 7° et à + 22° les crachats conservent leur virulence et leur végétabilité pendant toute cette période.

— Par contre, à + 37° aucun de ces crachats ne les conservent au delà du quatrième jour. Un cobaye inoculé à partir du cinquième jour présente simplement une légère allergie transitoire due aux bacilles morts mais ne présente ensuite à l'autopsie aucun signe de tuberculisation.

Il est permis de se demander s'il s'agit de l'action des ferments ou de la protéolyse par les anaérobies.

En 1912, GALTIER, CADEAC, MALET et MOUSSU (11) avaient étudié l'effet de la putréfaction des cadavres sur les bacilles tuberculeux ; dans ce cas, les bacilles vivent longtemps.

Par contre, dans des milieux riches en anaérobies protéolytiques, la virulence du bacille tuberculeux disparaît rapidement (12). Les germes banaux aérobies sont aussi détruits : un crachat conservé en vase clos, à l'étuve pendant quelques jours, ne donne naissance à aucune colonie après ensemencement sur de la gélose.

L'ensemencement du même crachat sur gélose Veillon donne lieu à un dégagement gazeux avec pullulation des anaérobies.

Une forte quantité du même crachat n'entrave pas le développement de différents germes en culture ; ce qui élimine l'hypothèse de la présence de substances bactéricides.

On peut donc penser en conclusion qu'il s'agit d'une lutte pour la vie où les anaérobies qui trouvent leurs conditions optima de développement dans un flacon à une température de 37° ont le dessus.

Il suffira pour remédier à cela d'ajouter une goutte de solution de pénicilline à 5.000 U/cm3 pour 1 cm3 de crachat. Le développement des anaérobies est entravé et permet la survie du bacille tuberculeux même après dix jours d'étuve (9).

Le problème est légèrement différent dans le cas des liquides de lavages gastriques : la surinfection banale est beaucoup moins importante et risque d'être moins génante, mais il faut plutôt craindre l'action de la *bile*, du *suc gastrique* et de *l'acide chlorhydrique*.

L'inoculation et la culture se montrent en général négatives vers le dixième jour de la conservation du liquide ; on peut donc se permettre sans inconvénient d'attendre trois ou quatre jours la collection d'un tubage en série.

Il est tout de même préférable d'effectuer l'envoi d'un lavage gastrique centrifugé en présence de pénicilline, comme pour un crachat.

En conclusion, il n'est besoin d'aucune précaution spéciale pour envoyer au laboratoire un produit pour examen microscopique.

Mais l'envoi d'un prélèvement en vue d'un diagnostic biologique devra se faire *à ph neutre, en présence de pénicilline*. Ceci est particulièrement important pendant l'été et dans les pays chauds.

On pourra conserver dans nos régions sans inconvénient, des crachats au cours d'une expectoration provoquée ou des tubages en vue d'un examen en série, de préférence en vase ouvert ou bouché au coton.

CHAPITRE SECOND

L'inoculation au cobaye

Le cobaye peut être considéré comme un milieu de culture vivant qui se caractérise par sa sensibilité, sa spécificité et sa sélectivité : en effet, s'il résiste mal à l'infection tuberculeuse, il se défend par contre assez bien contre l'infection due aux germes banaux qui accompagnent le bacille tuberculeux, il réalise ainsi un véritable isolement du bacille tuberculeux.

Mais le cobaye est un animal fragile et il est nécessaire d'augmenter sa résistance naturelle par un élevage sain et une alimentation équilibrée (13). Nous en parlerons brièvement.

Les cobayes sont élevés dans des cages sans écoulement ou la question de la litière est résolue par l'emploi de la tourbe mousseuse. Cette substance absorbe trente fois son poids d'humidité et les corps phénoliques qu'elle contient empêchent la putréfaction.

Les cages sont placées dans un local propre, aéré, ensoleillé et chauffé en hiver aux environs de quatorze degrés.

La nourriture consiste l'été en herbe fraîchement fauchée, l'hiver en foin et en betteraves fourragères. Trois fois dans l'hiver on distribue des vitamines mélangées à du son : pour 70 kg. de cobaye, on donne :

— Vitamine A : 350.000 U ;
— » B : 200 mg. ;
— » C : 1 gr.
— » D : 15 mg.

L'animal ainsi élevé présente une résistance remarquable. La mortalité est très réduite ; les affections intercurrentes sont rares (14).

En augmentant ainsi la résistance des animaux, on les aide à résister à des agressions microbiennes, mais il n'en reste pas moins que l'injection brutale d'un grand nombre de germes peut entraîner la mort par suppuration banale.

Pour éviter ce risque, on est donc amené à traiter les produits pathologiques à inoculer.

Nous allons passer rapidement en revue quelques-unes des diverses méthodes qui ont été utilisées dans ce but, puis celle qui a été préconisée à Praz-Coutant.

1. — MÉTHODES PRIMITIVES.

Elles n'ont plus qu'un intérêt historique, comme par exemple la méthode de MOREAU à l'éther (15), celle de AUBERTIN et FONTAN à la soude et violet de gentiane, celle de NATTAN-LARRIER à la chaleur discontinue.

2. — MÉTHODES UTILISANT DES MOYENS CHIMIQUES.

On emploie, comme pour la culture, la soude à 15 % ou à plus faible concentration (4 %) pendant 20' ou l'acide sulfurique à 15 % que l'on neutralise avant l'injection.

Ces méthodes ont l'inconvénient, comme nous le verrons plus en détail, de détruire un assez fort pourcentage de bacilles tuberculeux viables contenus dans l'inoculat, ce qui est gênant lorsqu'il s'agit de produits pauci bacillaires et peut être la cause de résultats faussement négatifs.

TISON a montré la perte de sensibilité des produits traités par la soude et par l'acide sulfurique par rapport au produit non traité (16). Vingt-quatre crachats finement mélangés ont été divisés en trois parties.

Un premier cobaye reçoit le produit non modifié émulsionné dans du sérum physiologique.

Un deuxième cobaye reçoit le produit traité à la soude à 15 % et le troisième le produit traité par l'acide sulfurique à 15 %, puis neutralisé.

Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau ci-dessous.

NUMÉRO DU GROUPE	PRODUIT non modifié	PRODUIT traité par la soude	PRODUIT traité par l'acide sulfurique
1	—	—	—
2	+	—	—
3	+	+	—
4	—	—	—
5	+	+	+
6	—	—	—
7	+	+	—
8	+	+	—
9	—	—	—
10	—	—	—
11	+	+	—
12	+	+	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	+	—	—
16	+	—	+
17	—	—	—
18	+	+	+
19	+	+	+
20	+	+	—
21	+	+	—
22	—	—	—
23	+	—	—
24	—	—	—
Négatifs	8 —	12 —	17 —
Positifs	16 +	12 +	7 +

On observe donc un gain très net avec le produit non traité.

3. — EMPLOI DES SULFAMIDES.

La sulfamido-thérapie préventive de l'animal par voie buccale permet d'inoculer un produit pur et d'éviter la mort de l'animal. Les abcès sont très rares et facilement guéris, s'ils se produisent, par une injection de sulfamides.

Les sulfamides n'ont pas d'effet sur la tuberculose expérimentale du cobaye ; la technique est simple (16).

On inocule au cobaye 2 cm3 du produit pur. On place ensuite l'animal dans sa cage avec, pour toute nourriture, une tranche de betterave tartinée de septoplix.

Les accidents sont rares et ne se produisent pas après le troisième jour.

Il n'en subsiste pas moins que l'injection de germes banaux déclenche les dispositifs de défense locale, en particulier une sollicitation du système lympathique.

Cette réaction locale n'a-t-elle pas des effets sur la tuberculisation de l'animal ? Et d'autre part l'élimination préalable des germes banaux n'accélère-t-elle pas l'évolution de la tuberculose du cobaye ?

Dans le but de vérifier cette hypothèse, deux groupes de treize cobayes ont été inoculés avec des produits pauci-bacillaires non surinfectés : liquide articulaire, pus d'abcès froid, liquide pleural (17).

Chaque animal du premier groupe a reçu un centimètre cube du produit pur. Un animal correspondant du deuxième groupe (même poids, même sexe, recevait 1 cm3 du même produit mélangé avec une goutte d'une culture en bouillon de un ou plusieurs germes banaux.

On constate que l'allergie apparaît plus fortement et plus précocément chez les animaux du premier groupe. L'autopsie y montre des lésions plus importantes ; alors que tous ces animaux sont tuberculisés, l'un des cobayes du deuxième groupe était indemne de toute lésion tuberculeuse.

En injectant au lieu des germes pyogènes de la fécule stérilisée, on obtient des résultats identiques. En injectant à la fois des germes et de la fécule, la tuberculisation du cobaye est encore plus retardée.

On peut penser que ce retard est dû à la réaction locale de défense au lieu même de l'injection et non pas à une action antibiotique possible de certains de ces germes.

4. — EMPLOI DE LA PENICILLINE.

L'élimination préalable des germes banaux par action in vitro de la pénicilline calcique — comme dans le cas du transport des produits surinfectés — semble une solution élégante qui permet de ne pas détruire une partie des bacilles tuberculeux viables, d'éviter toute réaction de l'organisme de l'animal, donc de conserver à l'inoculation tout sa sensibilité.

On avait d'abord pensé faire agir la pénicilline in vivo, pour remplacer les sulfamides démodées par un médicament plus actif.

Cela s'est avéré impossible : en effet, un traitement par la pénicilline chez un cobaye entraîne la mort de l'animal au bout d'un temps plus ou moins long.

GERNEZ-RIEUX, SEVIN et BAERENS ont étudié cette toxicité de la pénicilline ; une injection de 1.000 à 3.000 U.O. par voie sous-cutanée ou intra-dermique cause la mort dans 60 % des cas (18). Il s'agirait d'une action cytotoxique particulière vis-à-vis des cellules du cobaye.

HAUDUROY et ROSSET ont montré qu'une dose de 20 U.O. par gramme et par jour tuait le cobaye en quelques jours (19).

A l'autopsie, l'estomac vide, les viscères ne présentent pas de lésions macroscopiques ; on remarque un amaigrissement et un météorisme abdominal importants qui semblent avoir pour cause la suppression presque totale de la flore intestinale, ce que montre l'examen des selles d'un cobaye en cours de traitement par la pénicilline.

Par contre, in vitro, l'action sur le bacille tuberculeux est presque nulle.

Après ensemencement de liquides pleuraux non surinfectés avec et sans pénicilline, les colonies de bacilles tuberculeux sont apparues au même moment à quelques jours près.

La virulence d'une colonie de bacilles vivants secs mélangés à de la pénicilline en poudre, ne varie pas après dix jours de contact.

La solution est donc de faire agir la pénicilline in vitro avant l'injection.

La dose de pénicilline que l'on injecte ainsi est trop faible pour avoir un effet toxique sur le cobaye, mais suffit pour surmonter l'action des pénicillinases qui peuvent exister dans l'inoculat.

A condition d'utiliser de la pénicilline calcique, on ne risque pas de modifier les réactions cutanées de l'allergie tuberculeuse chez l'animal (20).

La méthode est simple : après neutralisation du produit en présence de tournesol, on ajoute trois gouttes d'une solution de pénicilline calcique dans le sérum physiologique à 5.000 U.O. par cm3. On inocule après quelques heures de contact à 37°.

Il est aussi possible d'ajouter directement la pénicilline en poudre prélevée avec une anse de platine.

5. — EMPLOI DE L'AUREOMYCINE.

L'étude d'un certain nombre d'antibiogrammes de germes banaux montre un pourcentage de plus en plus élevé de ces germes résistants à la pénicilline.

Nous avons relevé les résultats des cent derniers antibiogrammes de germes banaux effectués au Laboratoire central de Praz-Coutant (jusqu'au 15 mai 1955). Sur les cent germes qui avaient été testés, nous trouvons :

— 31 germes sensibles à la pénicilline et à l'auréomycine ;
— 50 germes sensibles à l'auréomycine seule ;
— 3 germes sensibles à la pénicilline seule ;
— 16 germes résistants à la pénicilline et à l'auréomycine.

Soit :

— 81 % des germes sensibles à l'auréomycine ;
— 34 % des germes sensibles à la pénicilline ;
— 16 % de ces germes résistants.

Un certain nombre d'auteurs ont vérifié l'augmentation de la résistance des germes à la pénicilline : CHABBERT et TERRIAL pour les staphylocoques pathogènes (21), TISON pour la flore des crachats (6).

Il était donc tentant de s'adresser, pour le traitement des produits à inoculer au cobaye à un autre antibiotique que la pénicilline.

L'action de l'auréomycine sur le bacille tuberculeux in vivo et in vitro étant bien étudiée, c'est cet antibiotique qui fut choisi.

L'action prolongée à l'étuve à 37°, in vitro, a été rejetée (22).

Il était peu pratique de traiter l'animal après inoculation ou d'injecter en une seule fois le crachat et l'antibiotique.

La méthode suivante a été proposée : c'est celle qui est maintenant pratiquée au Laboratoire central de Praz-Coutant.

On ajoute à deux centimètres cubes du produit à inoculer environ un centigramme d'auréomycine en poudre avec la pointe d'une öse en platine. On mélange dans la seringue en aspirant et refoulant plusieurs fois. On injecte au cobaye après dix minutes de contact.

Cette technique n'est pas seulement utilisable dans le cas des crachats et tubages gastriques, mais aussi pour les inoculations de culots d'urine ou d'autres produits qui peuvent être souillés par eds germes gram négatif pathogènes.

La présence de l'antibiotique in situ est utile. Les germes sont, de plus, préparés à la phagocytose par le contact de l'antibiotique (23). GERNEZ-RIEUX, TISON et VOISIN ont montré que cette phagocytose, chez le cobaye, ne pouvait rien contre le bacille tuberculeux (24).

Une comparaison avec la méthode à la pénicilline, qui portait sur des produits négatifs aux examens optiques, a montré un net avantage pour l'auréomycine (6).

Mais cette technique n'est pourtant pas encore parfaite.

En effet, nous venons de voir que sur cent germes banaux étudiés, nous en avions trouvé dix-neuf qui étaient résistants à l'auréomycine. Ce pourcentage, s'il est assez faible, peut quand même être la cause de quelques déboires. D'autre part, cette méthode ne peut pas protéger les animaux inoculés des affections intercurrentes spontanées auxquelles ils peuvent être sujets, entre autres des affections pulmonaires et broncho-pulmonaires, des affections intestinales (13).

Aussi nous a-t-il paru intéressant de compléter cette méthode par l'usage des sulfamides.

Nous donnons aux animaux des sulfamides en poudre (septoplix, fontamide) pendant les deux ou trois jours qui suivent l'inoculation.

Dans le cas où un animal est très fatigué, nous essayons de le faire survivre par des injections d'une suspension de sulfamide dans du sérum physiologique.

Cette méthode d'inoculation à des cobayes de produits surinfectés, ainsi pratiquée, nous a donné jusqu'ici entière satisfaction.

CHAPITRE TROISIÈME

Etude et critique des méthodes d'isolement du bacille tuberculeux en vue de la culture

Ce n'est pas un problème de bactériologie courante. S'il est relativement facile grâce à la culture d'isoler un germe quelconque d'un produit polyinfecté ou d'une culture de plusieurs germes par les méthodes courantes de dilution ou d'épuisement de la semence, il n'en est pas de même dans le cas du bacille tuberculeux.

Il est nécessaire d'isoler le bacille tuberculeux des germes qui l'accompagnent, non pas au cours de la culture, mais pour la culture ; il faut que le bacille tuberculeux soit seul dans la parcelle à ensemencer.

Le problème est le même que celui posé par l'inoculation au cobaye de produits polyinfectés : élimination de la flore secondaire sans léser le bacille tuberculeux, mais il se pose ici d'une manière beaucoup plus impérative.

Car s'il est possible d'inoculer un produit infecté à un cobaye sans qu'il en meure nécessairement, il est impossible d'ensemencer un tel produit sur les milieux de culture riches que réclame le bacille tuberculeux, sans que la flore d'accompagnement ne prolifère rapidement et n'empêche définitivement la pousse du bacille.

HISTORIQUE.

Pour résoudre ce problème on a proposé un certain nombre de procédés différents ; nous allons les passer rapidement en revue.

1° SPENGLER, dès 1900, préconise les antiseptiques en vapeurs.

La méthode au formol de SPENGLER (25) utilise une boîte de Pétri dont le fond est recouvert par une rondelle de papier filtre et dont la fermeture hermétique est assurée par le frottement d'une autre feuille qui déborde du couvercle. Après stérilisation, on étale un crachat sur le fond, on saupoudre de pancréatine et on laisse quelques heures à 37° pour permettre la digestion du mucus, puis on verse une dizaine de gouttes de formol sur le filtre du couvercle que l'on referme.

Après avoir laissé agir pendant deux heures à 20° on ensemence.

On constate qu'en plus de la purification cette méthode cherchait à homogénéiser le produit par l'action de la pancréatine, pour permettre l'ensemencement d'un liquide pur et fluide.

Depuis, on a toujours lié les deux buts : purification et homogénéisation.

En 1904, PIATKOWSKY (26) fait agir directement quelques gouttes de formol sur le produit.

2° La méthode de NATTAN-LARRIER (27) consiste en un chauffage discontinu pendant plusieurs jours à 54°.

3° UHLENHUT (28), en 1908, fait agir sur un crachat un volume égal d'antiformine à 30 % pendant une à deux heures en agitant de temps en temps. Après centrifugation et lavage du culot, on ensemence.

4° En 1915, PETROFF (29) fait faire de grands progrès à la culture du bacille tuberculeux grâce à sa méthode à la soude, qui est encore maintenant une des plus employées. C'est cette méthode qui a fait de la culture du bacille tuberculeux un moyen de diagnostic couramment employée.

Faire agir sur un crachat de la soude à 4 % en maintenant à 37° pendant une heure. Centrifuger et neutraliser le culot par l'acide chlorhydrique à 4 % en présence de tournesol.

Ce culot est ensemencé sur un milieu qui contient du violet de gentiane qui, par son action antiseptique, tue les germes qui auraient pu échapper à l'action de la soude.

Cette idée a été reprise ensuite par tous les auteurs qui ont mis au point des milieux de culture.

Le colorant qui est pratiquement le plus employé aujourd'hui est le vert malachite.

KIEKEN (30) a étudié son action antiseptique sur les germes banaux et vérifié qu'il n'avait pas d'influence sur le bacille tuberculeux.

5° PETRAGNANI (31) utilise aussi la soude à 4 % mais il neutralise directement par l'acide chlorhydrique avant de centrifuger.

6° En 1924, LOWENSTEIN et SUMIYOSHI emploient l'acide sulfurique à 15 % qu'ils laissent agir pendant quinze minutes sur le crachat. Ils ensemencent après centrifugation le culot lavé à l'eau physiologique.

En 1926, HOHN (32) utilise l'acide sulfurique à 10 % pendant vingt minutes. Il ensemence le culot sans neutralisation ni lavage.

En 1932, SAENZ et COSTIL (33) préconisent une méthode légèrement différente. On fait agir pendant trente minutes une quantité égale d'acide sulfurique à 15 % sur le crachat. On neutralise en présence de tournesol avec de la soude à 30 % jusqu'à teinte lilas. On ensemence.

7° CORPER et UYEI (34, 35, 36) emploient l'acide oxalique au lieu de l'acide sulfurique, MAC NABB (37) utilise l'acide chlorhydrique à 3 %, CORPER et STONER (38) le phosphate trisodique à 10 %, GOLDIE (39) préconise le carbonate d'ammonium.

8° Citons encore la méthode de JUNGMANN qui utilise l'action sur le crachat de deux solutions, l'une de sulfate de fer en milieu sulfurique, l'autre d'eau oxygénée à 1 %.

9° Les produits les plus divers ont été essayés : ammoniaque, eau de chaux, chlorure de sodium à forte concentration, borax, que nous ne citons qu'à titre de curiosités.

10° L'emploi de la pénicilline est intéressant :

ABBOT (40) montre que l'addition de pénicilline au culot d'ensemencement d'un crachat réduit le nombre des contaminations, sans inhiber la culture de bacille tuberculeux.

TISON préconise l'emploi de la pénicilline à la dose de trois gouttes d'une solution à 5.000 unités par centimètre cube (41).

11° AMBERT (42) fait agir la pepsine en milieu acide puis après centrifugation, la lessive de soude à 1 %.

La diversité et le nombre de ces différentes méthodes font penser qu'il n'y en a pas réellement de parfaite.

Le grand reproche que l'on puisse leur faire est de détruire, en plus des germes banaux, les bacilles tuberculeux dans un certain nombre de cas. Si ce fait est sans importance dans le cas de

produits fortement bacillaires, il devient désastreux dans le cas d'un produit paucibacillaire et enlève alors toute sensibilité à la méthode de la culture. Au contraire, avec un procédé idéal qui, détruisant toute la flore banale et homogénéisant convenablement le produit en donnant un culol de centrifugation minime et fluide, laisserait intacts *tous les bacilles tuberculeux viables* que ce produit contient, la culture rejoindrait en sensibilité l'inoculation au cobaye.

Parmi toutes ces méthodes que nous venons d'énumérer, toutes ne sont pas de valeur égale ; certaines sont moins mauvaises que les autres.

Il est intéressant de connaître leur toxicité respective sur les bacilles tuberculeux et d'étudier les avantages respectifs de celles qui sont employées couramment.

COMPARAISON DES MÉTHODES.

Plusieurs auteurs se sont attachés à cette étude.

GERNEZ-RIEUX, SEVIN et CHENET (43) ont comparé l'action de l'acide sulfurique à 15 % et l'action de la soude à 10 % sur des dilutions successives d'une souche de bacilles humains H37RV en milieu de DUBOS liquide. Chacune de ces dilutions était divisée en trois parties, dont l'une était traitée par la méthode de SAENZ et COSTIL, l'autre par la soude à 10 % et la troisième enfin restait intacte et était ensemencée sur PETRAGNANI, DUBOS liquide et DUBOS solide.

D'après le temps d'apparition des colonies et l'intensité de cultures, par rapport aux ensemencements témoins, ces auteurs remarquent l'action nocive de l'acide sulfurique et de la soude, surtout sur les produits paucibacillaires, ce qui se traduit pratiquement par une perte de rapidité et de sensibilité.

F. TISON (44) a étudié le problème de façon systématique.

Il a d'abord vérifié le pouvoir antiseptique de cinq méthodes de purification sur trois crachats polyinfectés par un séjour de 48 heures à 22°.

Les cinq méthodes étaient :

— addition de soude à 4 % ;
— » de phosphate trisodique à 5 % ;
— » d'acide oxalique à 5 % ;
— » d'acide chlorhydrique à 5 % ;
— » de carbonate d'ammoniaque à 2,5 %.

Des quinze préparations soigneusement mélangées, des prélèvements ont été ensemencés sur gelose au temps zéro, après 10, 20, 30 minutes, 1, 2, 3, 4, 6, et 12 heures.

Avec la soude, tous les germes sont éliminés en 10 minutes, de 15 minutes à 1 heure avec le phosphate trisodique, de 20 minutes à 6 heures avec l'acide oxalique, en 30 minutes avec l'acide chlorhydrique. Par contre, la plupart des germes étaient encore vivants au bout de 24 heures avec le carbonate de sodium.

TISON a ensuite étudié le pouvoir toxique sur le bacille tuberculeux de la soude, du phosphate et de l'acide chlorhydrique, c'est-à-dire les trois produits qui permettaient la purification la plus rapide.

Une suspension homogène de bacille tuberculeux a été divisée en trois parties.

Une partie a été additionnée de trois volumes de soude à 4 %, la seconde de six volumes de phosphate trisodique à 10 % et la troisième de trois volumes d'acide chlorhydrique à 3 %.

Des prélèvements ont été faits à des intervalles réguliers et ensemencés sur Loewenstein-Jensen.

On constate que, entre zéro et deux heures de contact environ, un tiers des bacilles tuberculeux sont tués pour chacune des trois méthodes. La survie de tous les germes restants est de douze heures pour la soude et l'acide chlorhydrique et de quarante-huit heures pour le phosphate.

SPENDLOVE, CUMMINGS et PATNODE (45) ont comparé différentes méthodes.

Une première expérience porte sur des suspensions aqueuses contenant 10—3 et 10—4 milligrammes de bacilles tuberculeux par cm3. Un centimètre cube de chacune de ces dilutions est mélangé à un centimètre cube des produits étudiés :

— soude 4 % ;
— acide chlorhydrique à 3 % ;
— acide sulfurique à 5 % ;
— carbonate d'ammonium à 2,5 % ;
— phosphate trisodique à 10 %.

Des prélèvements en sont ensemencés au bout de 40 minutes, 24, 48 et 72 heures.

Il ressort des chiffres donnés par les auteurs que les méthodes les moins toxiques pour le bacille tuberculeux sont celles à la soude, au carbonate d'ammonium et au phosphate trisodique. Avec l'acide chlorhydrique, l'antiformine et l'acide sulfurique, un faible pourcentage seulement de bacilles tuberculeux survit après 40 minutes de contact, aucun après 24 heures.

Une deuxième expérience sur des crachats positifs à l'examen direct donne des résultats identiques.

GRAY, CLARKE et JOHNSTONE (46) ont fait une étude très détaillée et très complète de la question.

Ils ont essayé six agents de purification d'abord sur une culture de bacilles tuberculeux humains, souche H 37 RV en milieu liquide.

Les résultats qu'ils énoncent sont éloquents :

— La soude à une concentration finale de 2 % tue 87,2 % de bacilles tuberculeux en 30 minutes.

— Le phosphate trisodique à une concentration finale de 11,5 % tue 87,5 % des bacilles tuberculeux en 24 heures.

— L'acide sulfurique à une concentration finale de 3 % tue 98,1 % de bacilles tuberculeux en 30 minutes.

— L'acide oxalique à une concentration finale de 2,5 % tue 99,3 % des bacilles tuberculeux en 30 minutes.

La méthode JUNGMANN à une concentration finale tue plus de 99,9 % des bacilles tuberculeux en 30 minutes.

Les mêmes essais avec des crachats paucibacillaires donnent des chiffres presque identiques.

D'autres auteurs arrivent à des conclusions semblables.

VAN KRANKEN (47) montre que la méthode au phosphate trisodique est la meilleure.

GISSENS DE CAVEL (48) compare le traitement à l'acide sulfurique à la soude, au phosphate trisodique. Il conclut que la méthode à l'acide sulfurique, si elle détruit mieux les germes secondaires, est plus nocive que la méthode au phosphate, pour les bacilles tuberculeux. La soude serait la plus mauvaise des trois.

De cette rapide revue des critiques que l'on peut faire aux méthodes de purification et des comparaisons entre elles, il ressort un fait assez net :

Si certaines sont indéniablement mauvaises, il en est deux qui sont considérées dans l'ensemble comme les plus intéressantes (49) : ce sont la méthode de PETROFF à la soude, et celle de CORPER et STONER au phosphate trisodique.

Il est assez difficile de choisir entre elles : leur pouvoir purificateur est comparable, ainsi que leur toxicité vis-à-vis du bacille tuberculeux.

Un meilleur pouvoir homogénéisant avait fait choisir au Laboratoire central de Praz-Coutant la méthode à la soude de PETROFF, légèrement modifiée.

On ajoute à 2 cm3 de crachats, 4 cm3 de soude à 4 % dans un tube à centrifuger de 60 cm3 à fond conique, stérile et couvert. On laisse en contact à la température du laboratoire et en agitant avec un agitateur de Kahn (50) pendant 30 minutes.

On ajoute alors quelques gouttes de teinture de tournesol stérile et on neutralise avec une solution d'acide sulfurique à 4/1000 jusqu'à couleur lilas. On centrifuge pendant une heure à 3.000, 4.000 tours. On ensemence le culot, après le rejet du liquide surnageant.

Mais des différents essais et des résultats que nous venons de résumer subsistait un sentiment de gêne : celui d'avoir choisi, non pas la meilleure méthode, mais la moins mauvaise.

> Cela nous a incité à rechercher une méthode de culture plus sensible et nous avons pensé utiliser non plus des agents *chimiques* comme dans toutes les techniques dont nous venons de parrle, mais des agents *physico-chimiques.*

CHAPITRE QUATRIÈME

Usage des tensio-actifs : Méthode au Teepol sodique dilué

Les modificateurs de la tension superficielle, aussi appelés corps tensio-actifs ou mouillants, sont des composés chimiques qui agissent sur les propriétés de la couche superficielle entre deux phases d'un liquide. En solution ces corps ont la propriété de solubiliser des substances qui sont insolubles dans l'eau, mais solubles dans les hydrocarbures (51).

LES TENSIO-ACTIFS :

Les tensio-actifs peuvent être classés en trois groupes :

1° *Tensio-actifs anioniques :*

— Sulfates d'alcoyles primaires ;
— Sulfates d'alcoyles secondaires ;
— Esters sulfonés ;
— Sulfates et sulfonates d'amides ;
— Alkyl aryl sulfonates ;
— Sulfonates cycliques.

2° *Tensio-actifs cationiques :*

— Amides grasses ;
— Hydrates d'ammonium quaternaires ;
— Bases à ammonium quaternaire ;
— Composés basiques de pyridinium et de quinolinium ;
— Dérivés des éthanol amines.

3° *Tensio-actifs non ioniques :*

— Consensats des corps gras, des alkylphénols, du mercaptan, avec l'oxyde d'éthylène.

L'une des caractéristiques remarquables de ces corps est leur activité antibactérienne. Cette propriété est bien connue et est utilisée dans le commerce par des marques d'antiseptiques chirurgicaux.

On connaît aussi le phénomène de NEUFELD : lyse des pneumocoques pathogènes par une solution de sels biliaires (qui possèdent des propriétés tensio-actives).

Par contre, DUBOS avait montré qu'un agent tensio actif non anionique, le Tween 80 qui est un ester de l'acide oléïque, était capable d'activer la culture de bacille tuberculeux. Il semble que le Tween 80 en « mouillant » le bacille le rende dispersible dans l'eau et augmente en quelque sorte la surface d'action du milieu sur le bacille.

« Ceci est dû au fait que le Tween est absorbé sur la portion lipidique de la surface du bacille ... » (52).

Ainsi, parmi cette famille de corps dont certains sont des antiseptiques puissants, il s'en trouvait un qui non seulement n'avait pas d'action néfaste sur le bacille tuberculeux, mais qui était un auxiliaire de sa culture.

Nous étions aussi au courant de travaux japonais, entre autres ceux de HOSOYA et SOEDA (53) et ceux de MINORU OKANO (54) sur l'isolement du bacille tuberculeux par certains corps tensio-actifs.

Nous avons donc été amenés à essayer des corps tensio-actifs en vue d'un nouveau procédé de culture moins toxique pour le bacille tuberculeux.

Les travaux de H. BERRY (55), de B.-H. JOHNSON, H. MIGAKI et B.-C. Mc CULLOCH (56), de KNOX, V.-H. AUERBACH, K. ZARUDNAYA et M. SPIRTES (57) sur les éléments anioniques et cationiques ; ceux de W.-P. ESELTINE et G. HUCKER (58) sur l'influence des matières organiques présentes, ceux de BROWNING, CALVER et PATERSON (59) sur l'homogénéisation des crachats nous ont aidé à choisir certains détergents.

Nous avons éliminé la plupart des dérivés à ammonium quaternaire après avoir constaté nous-même leur action léthale sur le bacille tuberculeux.

Notre étude a porté sur trois points :

1° Action destructrice sur les germes banaux ;
2° Action sur le bacille tuberculeux ;
3° Pouvoir homogénéisant sur les crachats.

Nous avons essayé six produits :

— Le Teepol, qui est une solution à 21 % de sulfate d'un alcool secondaire et de sodium. Il est fabriqué par la Shell par sulfatation des oléfines provenant du cracking des paraffines du pétrole. C'est un produit industriel contenant comme impureté importante environ 3 % de sulfate de sodium.

— Le Sipon Vl 20 } Sulfate d'alcool laurique neutralisé à
— Le Sipon L 20 } l'ammoniaque.

— Le Sipon L 230 } Sulfate d'alcool laurique neutralisé à la triéhanolamine.

— Le Sinnopon — Combinaison d'alkylsulfate et d'alkylarylsulfonate.

— Le Bradosol, qui est une solution à 10 % de bromure de phénoxy éthyl diméthyl dodécyl ammonium. C'est un produit pur fabriqué par Ciba. Ce dernier corps a été essayé à la suite de travaux de K. WAGENER, E. MITSCHERLICH et V. REUSS (60).

Les quatre premiers sont des anion-actifs et le dernier est un cation-actif.

Ce sont tous des produits liquides.

ETUDE DE L'ACTION DESTRUCTRICE SUR LES GERMES BANAUX.

Nous avons voulu nous placer dans les plus mauvaises conditions. Le matériel que nous avons utilisé était la flore de crachats ayant séjourné douze heures à l'étuve à 37°, ce qui correspond à la surinfection d'un prélèvement ayant voyagé en été.

Un volume de chacun des six mouillants étudiés a été ajouté à un volume de crachat dans un vase stérile ; le tout a été mélangé par agitation sur un agitateur de Kahn.

Des prélèvements ont été effectués dans chaque vase avant l'introduction du mouillant (témoin) aussitôt après (temps zéro) et après 1/4 d'heure, 1/2 heure, 3/4 d'heure et une heure de contact à l'agitateur.

Ces prélèvements lavés et centrifugés ont été ensemencés sur gélose nutritive et bouillon riche DIFCO.

La lecture a été faite après 48 heures de séjour à l'étuve à 37°.

Nous avons schématisé les résultats dans le tableau suivant :

Temps de contact à l'agitateur		Témoin	0	1/4 h.	1/2 h.	3/4 h.	1 h.
Teepol	Gel.	+ +	+	0	0	0	0
	Bouil.	+ +	+	0	0	0	0
Sipon VL 20	G.	+ +	0	0	0	0	0
	B.	+ +	0	0	0	0	0
Sipon L 20	G.	+ +	0	0	0	0	0
Sipon L 230	G.	+ +	0	0	0	0	0
	B.	+ +	+	0	0	0	0
Sinnopon	G.	+ +	0	0	0	0	0
	B.	+ +	0	0	0	0	0
Bradosol à 10 %	G.	+ +	0	0	0	0	0
	B.	+ +	0	0	0	0	0

Nous voyons que l'action destructrice sur les germes banaux est très satisfaisante.

ETUDE DE L'ACTION SUR LE BACILLE DE KOCH.

Ici aussi, nous avons tenu à nous mettre dans les conditions les plus mauvaises en faisant notre expérience avec une suspension dans le sérum physiologique de bacille humain H 37 RV.

Les bacilles, sans la protection qu'ils peuvent trouver dans le mucus des crachats, se trouvaient « nus » et plus vulnérables à l'action toxique des produits essayés.

Un volume de suspension bacillaire était additionné de deux volumes de chacun des mouillants.

Des prélèvements étaient faits avant l'introduction du mouillant, aussitôt après et après une demi heure, une heure, deux heures, six heures et vingt-quatre heures de contact.

Chacun de ces prélèvements, après lavage et centrifugation, était ensemencé sur deux tubes de Lowenstein Jensen fraîchement préparés.

La lecture dont le résultat est concrétisé dans le tableau suivant a été faite après douze jours de séjour à l'étuve à 37°.

Temps de contact	Témoin	0	1/2 h.	1 h.	2 h.	6 h.	24 h.	
Teepol	+ + +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	1er tube
	+ + +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	2me tube
Sipon L 20	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+ +	1er tube
	+ + +	Souillé	Souillé	+ + +	+ +	+ +	+ +	2me tube
Sipon L 230	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+ +	1er tube
	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	+ +	2me tube
Sinnopon	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+ +	1er tube
	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	2me tube
Bradosol	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	1er tube
	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	2me tube

L'action léthale de ces produits sur le bacille tuberculeux est donc faible.

Le Sipon VL 20 étant trop visqueux n'a pu être essayé.

ETUDE DU POUVOIR HOMOGÉNÉISANT.

L'étude en a été facile.

Nous avons mis en contact des crachats très muco-purulents avec chacun des produits précédents. Après lavage et centrifugation, il suffisait de comparer la qualité des différents culots obtenus.

L'examen du résultat de ces trois expériences est satisfaisant. Il y a une marge très grande entre le temps nécessaire pour détruire la totalité des germes banaux dans un crachat (environ un quart d'heure) et le temps nécessaire pour tuer les bacilles tuberculeux (plus de vingt-quatre heures).

On observe peu de différence entre les divers produits étudiés. Seul un meilleur pouvoir homogénéisant nous a fait choisir le Teepol et le Bradosol pour la suite de notre travail.

Nous avons aussitôt fait des essais de culture avec ces deux produits.

La technique utilisée était simple :

Dans un gros tube à centrifuger conique de 60 cm3, on mélangeait un volume de crachat avec deux volumes de mouillant. Après contact à l'agitateur pendant une demi-heure, le tube était rempli d'eau distillée stérile, agité à nouveau, puis centrifugé.

1) *Le Teepol :*

L'expérience a porté sur 55 crachats traités par moitié par la technique à la soude employée à Praz-Coutant et par moitié par le Teepol comme ci-dessus.

Le culot de centrifugation obtenu avec chacune des deux méthodes a été ensemencé sur quatre tubes de Loewenstein Jensen, soit 440 tubes ensemencés pour toute l'expérience.

Les résultats ont été décevants.

Le culot obtenu avec le Teepol était bon mais plus sirupeux qu'avec la soude. Alors que 91 tubes ont été positifs avec la soude,

89 l'ont été avec le Teepol. L'intensité des cultures obtenues sur les tubes positifs est à peu près égale pour les deux méthodes.

Mais il fallait noter au profit du Teepol une plus grande précocité de la végétation.

2) *Le Bradosol :*

La comparaison a été faite de la même manière, mais a porté sur moins de cas car les résultats ont été nettement inférieurs.

Le culot de centrifugation obtenu avec le Bradosol était assez bon, mais sec et se delitant mal.

VIALLIER et AUGAGNEUR, qui ont essayé des ammoniums quaternaires pour la culture du bacille de Koch, ont aussi remarqué cette mauvaise homogénéisation (61).

Etant donné les résultats des essais préliminaires, on pouvait penser que les résultats des essais pratiques seraient supérieurs à ceux que nous avons eus.

Il nous a semblé que la persistance du mouillant dans le culot de centrifugation était la cause de cet échec : en effet, dans le cas du Teepol, la présence du mouillant se traduisait par l'aspect sirupeux du culot qui s'étalait bien à la surface du milieu. Dans le cas du Bradosol, des morceaux du culot à la surface du milieu semblaient avoir une action empêchante sur les bacilles tuberculeux dont les colonies s'étaient développées à distance de ces fragments.

Il y avait comme une zone d'inhibition autour d'eux.

Un seul lavage avant la centrifugation étant donc insuffisant, nous avons fait plusieurs lavages sans pouvoir éliminer le mouillant (qui est pourtant un corps soluble dans l'eau) du « complexe » qu'il semblait faire avec le crachat.

Nous avons ensuite essayé de digérer le crachat avant de faire agir le mouillant, grâce à de la papaïne, puis de la pepsine : les résultats n'ont pas été meilleurs.

Nous avons alors pensé diluer le mouillant *avant* son emploi puisqu'il était impossible de le faire après, c'est-à-dire faire agir sur le crachat le mouillant à des concentrations plus faibles.

Nous avons essayé d'abord des solutions de Teepol à 50 %, 25 % et 10 %, contenant donc respectivement environ 10 %, 5 % et 2 % de produit actif.

Le pouvoir toxique sur le bacille tuberculeux ne pouvant être supérieur à celui du Teepol non dilué, nous avons vérifié le pouvoir germicide qui était suffisant.

Par contre, le pouvoir homogénéisant de ces trois solutions était mauvais.

L'idée nous est alors venue, puisque la soude est un bon homogénéisant, d'utiliser le Teepol en solution alcaline, faisant ainsi en quelque sorte une synthèse des deux méthodes.

Le Teepol sodique s'est révélé effectivement un homogénéisant parfait, mais le Bradosol sodique donnait un précipité coriace inutilisable avec le crachat.

Nous avons donc abandonné le Bradosol, pour ne plus nous intéresser qu'à *l'association Teepol-Soude.*

Pour faciliter notre travail, nous avons copié la méthode à la soude que nous utilisons jusqu'ici.

Le matériel et le mode opératoire sont les mêmes.

Le mélange du crachat et de la solution de Teepol sodique est agité pendant une demi-heure dans un tube à centrifuger conique puis neutralisé et centrifugé. On ensemence le culot.

Nous pouvions ainsi, puisque les deux techniques étaient jumelles (seuls changeaient les réactifs) mener la comparaison entre elles avec le maximum de sûreté.

Nous avons décidé d'utiliser une concentration de soude de 1 % ; quant au Teepol, nous nous sommes décidés pour une concentration de 25 %.

En effet, une solution de Teepol à 10 % et 1 % de soude a été rejetée tout de suite, car si la destruction des germes banaux était convenable, l'homogénéisation était nettement insuffisante : nous obtenions avec des crachats très purulents une masse jaunâtre et gélatineuse, alors qu'avec les mêmes crachats la soude à 4 % donnait un culot filant et légèrement visqueux, presque normal.

Par contre, l'homogénéisation était parfaite avec une solution de Teepol à 25 % et 1 % de soude ; et nous avons déjà vu que cette concentration de Teepol détruisait efficacement les germes banaux.

Voici le protocole de la technique que nous proposons :

A 2 cm3 de crachat, ajouter 4 cm3 de la solution suivante :

Teepol	25 cm3
Soude en pastilles	1 g.
Eau distillée	Q.S.P. 100 cm3

Verser dans un tube à centrifuger conique stérile. Agiter une demi-heure à l'agitateur de Kahn.

Ajouter la solution stérile suivante :

Acide sulfurique à 66° B	1 cm3
Pourpre de bromocrésol à 1/250 ..	1 cm3
Eau distillée	1 litre

que l'on verse jusqu'à l'apparition de nuages jaunes (dilution et neutralisation).

Centrifuger à 3.000 tours pendant une heure et ensemencer le culot sur six tubes de Loewenstein-Jensen fraîchement préparés.

Nous avons fait une étude critique systématique de cette méthode avant de passer aux essais pratiques proprement dits sur des produits pathologiques inconnus.

Nous avons d'abord étudié les facteurs qui peuvent agir sur le bacille tuberculeux avant l'ensemencement, c'est-à-dire le Teepol et la soude ; puis les facteurs qui interviennent au cours de la neutralisation et après l'ensemencement : le pH du culot, la présence d'un indicateur coloré, formation de sulfate de sodium, persistance du colorant et du Teepol dans le culot d'ensemencement.

CHAPITRE CINQUIÈME

Etude systématique des différents facteurs en jeu dans la méthode au Teepol

1. — FACTEURS QUI INTERVIENNENT DANS LE PREMIER TEMPS DE LA TECHNIQUE : ACTION DU TEEPOL-SOUDE PENDANT UNE DEMI HEURE.

Nous avons cherché quel pouvait être le pouvoir toxique sur les bacilles de Koch non protégés et en suspensions paucibacillaires :

— de la soude à 4 % ;
— de la soude à 1 % ;
— du Teepol à 25 % ;
— du Teepol à 25 % + soude à 1 %.

Cette expérience nous permettrait, grâce à la comparaison avec l'action de la soude à 4 %, d'avoir déjà une idée de la valeur possible de notre méthode.

A partir d'une suspension homogène de bacilles humains, souche H 37 RV, nous avons fait des dilutions successives au 1/10, 1/100, 1/1000...

A un centimètre cube de chacune de ces dilutions nous avons ajouté deux centimètres cubes de chacun des produits étudiés.

Après une demi-heure de contact, après neutralisation et centrifugation, chaque culot était ensemencé en totalité sur trois tubes de Loewenstein-Jensen.

Pour chacune des dilutions, un témoin était traité d'une manière identique : un centimètre cube était dilué avec de l'eau stérile, centrifugé et ensemencé.

Au cours de la préparation des dilutions et du prélèvement d'un centimètre cube dans chacune d'elles, toutes les précautions ont été

prises pour éviter le plus possible les erreurs dues à la mauvaise répartition de bacilles (utilisation de ballons sphériques, agitation prolongée, prélèvement au centre de la masse du liquide).

Nous avons fait deux lectures sur les deux dernières dilutions qui avaient poussé (1/100 et 1/1000) :

— une lecture précoce après douze jours d'étuve à 37° ;

— une lecture tardive après 17 jours d'étuve à 37°.

Les résultats en sont schématisés dans le tableau suivant :

	Témoin	Soude 4 %	Soude 1 %	Teepol 25 %	Teepol sodique
12 jours *1/100*	+ +	0	0	+ +	+ +
17 jours	+ + + +	+ +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
12 jours *1/1000*	+ +	0	0	+ +	+
17 jours	+ +	+	+ +	+ +	+ +

Le Teepol à 25 % n'a pas d'influence néfaste sur la vitalité du bacille tuberculeux.

La soude à 1 % a une action assez sensible, mais beaucoup moins que la soude à 4 %.

Le mélange Teepol à 25 % et soude à 1 % est moins toxique que la soude à 1 % seule. Ce fait est assez curieux ; le Teepol jouerait-il vis-à-vis du bacille un rôle protecteur contre les effets de la soude ?

2. — FACTEURS QUI INTERVIENNENT AU COURS DE LA NEUTRALISATION-DILUTION ET APRÈS L'ENSEMENCEMENT.

Le pH. — Le bacille de Koch se développe à un pH optimum de 6,8.

Ce pH est obtenu — grâce au système tampon du milieu lui-même qui corrige les variations de pH que peut présenter le produit ensemencé — dans le produit ensemencé lui-même, grâce à la neutralisation de la soude par l'acide sulfurique.

Ce pH parfait n'est pratiquement jamais atteint au cours de cette neutralisation. En effet, lorsqu'on étudie les variations du pH au cours de la neutralisation acide-base, on s'aperçoit que ces variations sont très fortes aux abords de la neutralité pour de très faibles quantités de base ou d'acide ajoutées. La courbe de ces variations est en forme d'S.

Le virage du bleu au jaune a lieu, pour le pourpre de bromocrésol, entre les pH 6,8 et 5,3.

Il faudrait donc pour amener notre produit à 6,8 faire un titrage précis avec une burette « à la goutte ». Cela est impossible en bactériologie, où il faut éviter les manipulations compliquées, travailler vite et aseptiquement.

Nous versons donc rapidement la solution stérile d'acide sulfurique à 1 % qui contient l'indicateur coloré dans le mélange crachat et Teepol sodique. Nous nous arrêtons *à l'apparition de nuages jaunes* au milieu de la couleur bleue qu'avait prise le liquide.

Nous évitons d'aller jusqu'au virage complet au jaune franc, ce qui indiquerait un pH inférieur à 5. En restant à la limite de ce virage nous avons le plus de chance de nous trouver aux confins de la neutralité.

De toutes façons, les petites erreurs de pH seront compensées, comme nous venons de le dire, par le système tampon du milieu et d'autant mieux que le culot sera ensemencé sur six tubes de ce milieu (3).

Le faible pourcentage de la solution d'acide sulfurique et le volume important de dilution que l'on obtient (environ 30 cm3) permettent d'éviter tout échauffement au cours de cette neutralisation.

Le poupre de bromocrésol. — Nous avons préféré cet indicateur coloré à la teinture de tournesol : non seulement il vire à pH 6,8, supporte la stérilisation à l'autoclave, mais il se conserve en solution, ce qui permet de l'inclure à la solution acide stérile (62).

Cela était impossible avec la teinture de tournesol que l'on devait ajouter extemporanément dans le liquide à neutraliser.

Les traces de colorant qui restent dans le culot ne peuvent être néfastes à la végétation des bacilles : sachant que 1.000 cm3 de la solution acide contiennent 1 cm3 d'une solution de poupre de bromocrésol à 1/250, il est facile de calculer qu'il reste environ 1,5 microgramme de colorant dans un demi centimètre cube de culot. Chaque tube en reçoit donc environ 0,25 microgramme.

Le pouvoir bactériostatique du pourpre de bromocrésol commence à une concentration de 0,025 %.

Le sulfate de sodium. — La quantité de sulfate de sodium formée au cours de la neutralisation de la soude par l'acide sulfurique est de 0,07 gr., donc environ 0,2 mgr. par tube, ce qui est sans action (33). La quantité de sulfate de sodium qui se trouve dans le teepol à l'état d'impureté est négligeable.

Etant donné les faibles quantités d'acide sulfurique en jeu, le temps de contact réduit et la température de la réaction, il semble peu probable, comme le craignent certains auteurs (63) qu'il se forme des dérivés sulfonés toxiques.

Le Teepol. — La dose de produit actif qui subsiste dans le culot d'ensemencement peut être évaluée à environ 3,25 milligrammes. Nous avons vérifié si la dose de tensio actif ainsi présente dans l'inoculat de chaque tube (environ 0,6 milligramme) avait une action sur la végétabilité du bacille tuberculeux.

Sur des tubes de Jensen, nous avons ensemencé une souche de bacilles H 37 RV très diluée ; un premier lot de tubes (témoin) n'a reçu que la suspension de bacilles à raison de 1/10 de centimètre cube par tube ; un deuxième lot a reçu en plus des bacilles une dose de Teepol trois fois supérieure à la dose normalement persistante dans l'inoculat d'un tube : le troisième lot recevait une dose trente fois supérieure.

La lecture a été faite après douze jours de séjour à l'étuve à 37°.

	1	2	3	4	5	6
Tubes témoins	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
Tubes à 3 doses de Teepol	+ + + +	+ +	+ + + +	+ + +	+ + + +	+ + +
Tubes à 30 doses de Teepol	+ + +	+	+	+ +	+ + +	+ +

Il semble donc que la persistance du mouillant ait une légère action néfaste sur la végétation du bacille.

Il est très facile d'éliminer presque complètement le Teepol résiduel en effectuant *un deuxième lavage* avec du sérum physiologique stérile, avant l'ensemencement.

ESSAIS PRATIQUES : COMPARAISON AVEC LA MÉTHODE A LA SOUDE.

Après les essais théoriques précédents, nous sommes passés au stade pratique de l'expérimentation.

Nous avons traité tous les produits pathologiques secondairement infectés, crachats, tubages, urines, que nous recevions journellement au Laboratoire par les deux méthodes.

Chaque produit était équitablement divisé en deux parties. L'une d'entre elles était traitée par deux volumes de soude à 4 % pendant une demi-heure et la deuxième par deux volumes de Teepol sodique pendant le même temps. Chacune culot de centrifugation était ensemencé sur quatre tubes de Jensen (donc huit tubes pour chaque produit) de la même série de fabrication.

Ces tubes de milieu étaient fabriqués au laboratoire, avec les plus grandes précautions d'asepsie, en employant des œufs frais dont le pH était contrôlé...

2.400 tubes ont été ensemencés.

Nous n'avons pas porté les résultats de ces 400 cultures dans un tableau dont la lecture serait fastidieuse, mais nous avons simplement résumé ces résultats.

	Soude à 4 %	Teepol-soude
Cultures positives	75	109
Cultures positives avec une des méthodes et négatives avec l'autre	4	33
Tubes souillés sans compromettre toute la culture	39	25
Cultures entièrement souillées .	3	0
Temps moyen d'apparition des colonies	25 jours	18 jours
Note proportionnelle au nombre de colonies (1)	Total des notes 459	Total des notes 825

Ces résultats sont très satisfaisants et confirment ce qu'avaient laissé prévoir les expériences préliminaires.

Après cette comparaison sur 400 cultures, nous avons abandonné la méthode à la soude à 4 % pour utiliser notre méthode pour le travail courant du laboratoire.

Nous avons traité depuis 667 produits pathologiques souillés. 4.002 tubes de Jensen ont été ensemencés.

— Aucune culture n'a été entièrement souillée ;

— 24 tubes ont été souillés sans compromettre la culture.

Nous n'avons pas la prétention de croire cette méthode parfaite. Nous pensons simplement qu'elle est moins mauvaise que les autres méthodes qui ont été proposées jusqu'ici.

Telle que nous la proposons, elle est perfectible :

— Le premier perfectionnement à lui apporter doit être la diminution, sinon la suppression, de la soude ; c'est la présence de 1 % de soude qui semble être le facteur le plus néfaste de cette méthode.

(1) Nous avons attribué une note à chaque tube :
1 au tube contenant de rares colonies ;
2 » » » quelques colonies ;
3 » » » de nombreuses colonies ;
4 » » » des colonies innombrables.

— Si la destruction des germes banaux est bonne, celle des champignons l'est moins : il nous est difficile de détruire les spores de champignons qui se trouvent dans les expectorations d'un malade.

Il en est de même pour les spores de champignons qui flottent dans l'air ambiant ; si cela n'a pas une grande importance dans un laboratoire de sanatorium, comme le nôtre, à 1.200 mètres d'altitude où l'air est pur, il peut en être autrement dans une grande ville.

Il est évident que cette méthode, appliquée dans un laboratoire de grande ville, laisserait passer plus de souillures qu'à Praz-Coutant.

Le milieu de Loewenstein-Jensen est le milieu de culture pour le diagnostic du bacille tuberculeux qui nous a donné les plus grandes satisfactions.

Mais il est évidemment perfectible lui aussi.

CONCLUSIONS

La coexistence dans un certain nombre de produits pathologiques (crachats, liquides de tubages gastriques, urines) de germes banaux saprophytes et du bacille tuberculeux pose des problèmes au bactériologiste.

Si la présence de ces germes n'est pas gênante dans les produits destinés à être examinés au microscope, il n'en est pas de même dans ceux qui doivent être cultivés ou inoculés au cobaye.

Nous avons vu que, déjà au cours du transport, des germes anaérobies pouvaient par leur développement excessif détruire le bacille de Koch dans le prélèvement lui-même.

Le cobaye représente un milieu de culture vivant et sélectif qui est capable d'isoler le bacille tuberculeux de ses germes d'accompagnement ; mais il est tout de même sensible à une infection banale secondaire : s'il n'en meurt pas, sa tuberculisation, nous l'avons montré, en est retardée.

Il est donc nécessaire de détruire les germes d'infection secondaire dans l'inoculat en laissant intact le bacille tuberculeux.

Nous avons rappelé les diverses méthodes employées dans ce but et exposé celle que nous utilisons personnellement et qui nous semble la plus intéressante.

Le problème se pose d'une manière plus cruciale pour la culture : sur les milieux très riches que l'on utilise, les germes banaux poussent très vite et empêchent le développement des colonies de bacilles de Koch. Il faut donc, ici aussi, détruire les germes d'infection secondaire avant l'ensemencement.

Nous avons rappelé les méthodes existantes.

Nous avons analysé des travaux qui montrent que ces méthodes, en même temps qu'elles détruisent les germes banaux, tuent aussi un fort pourcentage des bacilles viables, ce qui est catastrophique lorsqu'il s'agit de produits pauci-bacillaires.

Nous avons essayé de mettre au point une méthode de culture meilleure.

Nous nous sommes adressés aux corps abaisseurs de la tension superficielle, ou corps tensio-actifs.

Nous avons étudié plusieurs produits.

Après avoir vérifié leur pouvoir destructeur sur les germes banaux et leur non-toxicité sur le bacille de Koch, la nécessité d'obtenir des homogénéisations parfaites nous a fait choisir le Teepol.

Un protocole de technique copié sur celui de la méthode à la soude précédemment employée, nous a permis de faire une comparaison portant sur 400 cultures, comparaison qui a révélé une nette supériorité de la méthode au Teepol.

Nous avons aussi étudié systématiquement l'action possible sur une souche de bacilles humains H 37 RV de tous les facteurs qui entrent en jeu dans notre technique.

Nous croyons avoir mis au point une méthode de culture plus sensible que toutes les autres méthodes qui avaient été proposées jusqu'alors.

Au terme de notre travail, nous voulons dire un mot de la hiérarchie des examens de laboratoire pour la tuberculose, hiérarchie au sein de laquelle notre méthode de culture doit venir s'intégrer.

Cette hiérarchie s'établit ainsi :

— frottis direct, homogénéisation sur deux lames, tubage gastrique sur deux lames, culture, inoculation au cobaye.

Mais la nécessité de faire des cultures et des inoculations à partir de produits positifs pour étudier la résistance du germe aux antibiotiques et sa virulence, ainsi que l'étude des pièces d'exérèse, ont montré qu'il existait des bacilles visibles non végétables et non virulents (10).

Aussi est-il difficile au phtisiologue de se baser entièrement sur la hiérarchie des examens qui autorisait P.-E. DAVY à faire une « courbe de laboratoire » (8).

Il convient donc d'effectuer *tous* les examens avant de déclarer un malade négatif, et de ne pas se fier au résultat qui peut être faussement négatif de la méthode la plus sensible.

Encore faut-il savoir comment ont été faits ces examens, quelles techniques ont été employées.

Dans l'état actuel de la phtisiologie, il est nécessaire de confronter les résultats obtenus par des thérapeutiques différentes, aussi bien médicales que chirurgicales.

Ces confrontations n'ont de valeur que si l'on s'entend sur le terme de *malade négatif.*

MAURER a démontré que l'applications de techniques correctes avait fait baisser dans un service la proportion de cavitaires négatifs de sept huitièmes (64).

Un frottis direct n'est valable qu'après l'examen, pendant une demi-heure, de l'étalement d'une parcelle choisie.

P.-E. DAVY et J.-C. LEVADITI ont montré que le coefficient de sensibilité d'une homogénéisation passait de 4,2 pour une vitesse de centrifugation de 2.000 tours-minutes à 27,8 pour 5.000 tours-minutes, et de 18,3 pour une durée de quinze minutes à 35,7 pour une durée d'une demi-heure (65).

Il n'y a pas de comparaison entre la culture d'un prélèvement traité par la méthode au Teepol sodique et ensemencé sur six tubes de Jensen préparés au laboratoire et la culture du même produit traité par la soude à 15 % pendant vingt-quatre heures et ensemencé sur quatre tubes du commerce.

De même, on ne peut comparer les résultats donnés par deux inoculations, l'une d'un crachat traité par l'acide sulfurique, à un animal sacrifié après un mois et demi, l'autre de ce crachat traité par l'auréomycine, à un animal surveillé pendant quatre mois.

Il serait donc souhaitable qu'il pût exister un jour une *standardisation des examens* employés pour la recherche du bacille tuberculeux : standardisation des méthodes, du protocole des techniques, de la fabrication des milieux de culture, standardisation de l'ordre d'utilisation des divers examens.

C'est sur ce vœu que nous terminerons ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

(1) P. LOWYS. — Soc. Tub., 13 nov. 1948.

(2) H.-J. CORPER. — J. Am. Méd. Ass., 1928, *91*, 371.

(3) F. TISON. — *Les facteurs néfastes à la culture du bacille de Koch à partir de produits pathologiques.* Ann. Inst. Past., 1952, *82*, 484.

(4) R. DEBRÉ, MOZZICONACCI, DROUET. — *Mycoses consécutives au traitement par les antibiotiques.* Sem. des Hôp. Paris, 22 décembre 1954, 4258.

(5) BICKEL G. — *Les complications de la thérapeutique antibiotique.* Concours Médical, 1954, *76*, p. 2.085.

(6) F. TISON. — *Nouvelle technique d'inoculation au cobaye de produits surinfectés pour la recherche du bacille tuberculeux. Usage de l'auréomycine.* Ann. Inst. Past, 1953, *85*, 274.

(7) F. BEZANÇON, S. I. de Jong. — *Traité sur l'examen des crachats.* Masson (Paris), 1913.

(8) P.-E. DAVY. — Rapp. Acad. Méd. 1946.

(9) F. TISON. — *Persistance des caractères morphologiques et biologiques des bacilles de Koch dans les produits expédiés au laboratoire.* Ann. Inst. Past., 1947, *73*, 684, 687.

(10) *Le Poumon*, juin-juillet 1954, n° 6.

(11) GALTIER, CADEAC, MALET et MOUSSU. — *Compte-rendu de la Caisse Nationale des Recherches Scientifiques*, 1912.

(12) PASSINI. — Wien. Klin. Wochensehr, 1925, *38*, 1.182.

(13) J. PARAF. — *La tuberculose du cobaye.* Masson (Paris), 1939.

(14) F. TISON. — *La recherche du bacille tuberculeux par inoculation au cobaye en pratique courante.* Rev. de la Tuberc., 1953, *17*, p. 831.

(15) Ed. MOREAU. — *Techniques de laboratoire pour le diagnostic de la tuberculose.* Maloine (Paris), 1926.

(16) F. TISON. — *Comparaison des méthodes d'inoculation aux cobayes pour la recherche du bacille de Koch dans les crachats. Supériorité de l'inoculation du produit non modifié chez le cobaye traité par les sulfamides.* Ann. Inst. Past., 1947, *73*, 186, 188.

(17) P. LOWYS, F. TISON. — *La bactériologie.* Pédiatrie, 1952, 7.

(18) Ch. GERNEZ-RIEUX, H. BEERENS. — *Toxicité de la pénicilline pour le cobaye.* Ann. Inst. Past., Lille, 1949, *11*, 100, 107.

(19) P. HAUDUROY, Willy ROSSET. — *A propos de l'action accélérative de la pénicilline sur la tuberculose expérimentale du cobaye.* Ann. Inst. Past., 1948, 75, 67, 69.

(20) P. HAUDUROY, W. ROSSET. — *Pénicilline et Tuberculose.* Rev. de la Tub., 1946, *10*, 32, 35.

(21) Y. CHALIBERT et G. TERRIAL. — *Evolution actuelle des types de résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques pathogènes.* Ann. Inst. Past., 1952, *83*, 499, 505.

(22) G. RAKE et R. DONOVICK. — *Tuberculostatic activity of aureomycin in vitro and in vivo.* Am. Rev. Tuberc. 1949, *60,* 143.
(23) S. LAMBIN, A. DESVIGNES. — *Influence de quelques substances antibactériennes sur le phénomène de phagocytose.* Ann. Inst. Past., 1953, *84,* 745.
(24) GERNEZ-RIEUX, TISON et VOISIN. — *Rapport au XI^e Congrès de la Tuberculose.* Masson, édit. 1953.
(25) SPENGLER. — *Zeitschr f. Hyg.* t. XLII, p. 90, 1924.
(26) PIATKOWSKI. — Deut. Med. Woch., 1904, *30,* p. 878.
(27) NATTAN-LARRIER. — *Traité de Microbiologie.* Doin édit., Paris, 1931.
(28) UHLENHUT. — Deut. Klin. Woch, 1908, n° 27.
(29) PETROFF. — Journ. Of. Exp. Med., 1915, *22,* p. 38.
(30) Renée KIEKEN. — *Sur l'utilisation du milieu de Bordet Gengou pour la recherche des bacilles tuberculeux.* Thèse pharmacie, Lille, 1946.
(31) PETRAGNANI. — Bull. Ist. Sierot. Milanese, Fasc. 3, 1926 et 1928.
(32) HOHN. — Centr. f. Bakt. I. O. 1926, *98,* p. 460.
(33) L. COSTIL, A. SAENZ. — *Diagnostic bactériologique de la tuberculose.* Masson (Paris) 1936.
(34) H.-J. CORPER, N. UYEI. — *Oxalic acid as a reagust for isolating tubercle bacille.* J. Lab. and Clin. Méd., 1930, *15,* 348.
(35) H.-J. CORPER, N. UYEI. — *Additional observation on isolating tubercle bacille : the oxalic acid. reagent fort primary culture.* Ann. J. Clin. Path., 1931, 1, 135.
(36) H.-J. CORPER, N. UYEI. — *The isolation of tubercle bacilli from contaminated tuberculous materials.* Am. Rev. Tub., 1927, *16,* 293.
(37) MAC NAB. — Am. J. Publ. Health, 1936, *26,* 619.
(38) CORPER et STONER. — J. Lab. and Clin. Med., 1946, *31,* 1.364.
(39) GOLDIE. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1947, *65,* 310.
(40) J.-N. ABBOTT. — *Effective use of penicillin to reduce contamination in sptutum concentrates to be examined fort tubercle bacilli.* Amer. J. Publ. Health, 1951, 41, p. 287, 291.
(41) F. TISON. — *Culture de bacille de Koch à partir de crachats non modifiés en présence de pénicilline.* Ann. Inst. Pasteur, 1947, *73,* 407.
(42) P. AMBERT. — *Isolement du bacille tuberculeux dans les produits pathologiques souillés. L'épuration microbienne résolue par l'homogénéisation pepsine-soude.* Ann. Inst. Past., 1952, 83, 805-9.
(43) Ch GERNEZ-RIEUX, A. SEVIN, C. CHENET. — *Sur la valeur du milieu de Dubos pour le diagnostic de la tuberculose à partir de produits pathologiques.* Ann. Inst. Pasteur, Lille, 1949, *11,* 27, 56.
(44) F. TISON. — *Elimination des germes banaux dans les crachats destinés à la culture du bacille de Koch. Applications et perfectionnement.* Ann. Inst. Pasteur, 1951, *80,* 659.
(45) G.-A. SPENDLOVE, M.-M. CUMMINGS, R.-A. PATNODE. — *Toxicity of sputum digestants to tubercle bacilli in water and suptum.* Am. Rev. Tuberc., 1949, *60,* 628, 633.
(46) D.-F. GRAY, B.-L. CLARKE, M.-W. MATTINSON. — *Detection of small numbers of tubercle bacilli in treated specimens.* Am. Rev. Tub., 1954, 69, 92, 103.
(47) VAN KRANKEN. — *Diagnostic culture of tubercle bacilli.* Am. Rev. Tub., 1947, 65, 374, 378.

(48) G. GISSENS DE CAVEL. — *Au sujet des méthodes d'isolement et de culture des bacilles de Koch.* Rev. belge Path. et Méd. exp., 1949, *19*, 309, 317.

(49) H. STARKEY et E. AUBERT. — *The use of tri-sodium phosphate in techniques for the isolation of « M. Tuberculosies ».* Canad. J. Public. Health, 1950, *41*, 27, 30.

(50) W.-J. STEENKEN, M.-M. SMITH. — *A shaking machine and containers for shaking sputums, and other body fluids during the process of homogénéisation.* J. Lab. and Clin. Med., 1942, *27*, 1.582.

(51) L. KAERTKEMEYER. — *Les agents tensio-actifs.* Rev. des Questions Scientifiques, juillet 1954, 352.

(52) R. DUBOS, G. MIDDLEBROOK. — *Media for tubercle bacilli.* Am. Rec. Tuberc., 1947, *56*, 334.

(53) HOSOYA et SOEDA. — Yokohama Med. Bull., 1951, *2*, 311.

(54) MINORU OKANO. — *Investigation ont the method of isolation of tubercle bacilli from sputum applying invert soap.* Yokohama Med. Bull., 1951, *4*, 249.

(55) H. BERRY. — *The bactericidal action of phenols in aqueous solutions of soap.* Chem. industr., 1952, 266.

(56) B.-H. JOHNSON, H. MIGAKI et E.-C. Mc CULLOCH. — *Further inquiry into the antibacterial properties of cationic and anionic détergents. A comparison of an « in vitro » and an « in vivo » method of evaluation.* Amer. J. Publi. Health, 1952, t. 42, p. 801, 805.

(57) W.-E. KNOX, V.-H. AUERBACH, K. ZARUDNAYA et M. SPIRTES. — *The action of cationic detergents on bacteria and bacterial enzymes.* J. Bact., 1949, t. 58, p. 443, 452.

(58) W.-P. VAN ESELTINE et G. HUCKER. — *The effect. of organic matter on germicidal action of the quaternary ammonium compounds N. Y.* State agric. exper. station techni. Bull. 1948, N° 282, p. 1-20.

(59) BROWNING, CALVER et PATERSON. — *Teepol in the preparation of sputum for tubercle culture.* Brit. Med. Journal, juin 1953.

(60) Wagener MITSCHERLICH et REUSS. — *Nachweiss von Tuberkelhakterien in abwasser von tuberkuloseheiltaehen.* Gesdh. Ing., 1953, *74*, 9, 10.

(61) J. VIALLIER, J. AUGAGNEUR. — *Traitement par les ammoniums quaternaires des produits pathologiques pour l'isolement du bacille tuberculeux.* Ann. Inst. Pasteur, 1955, *88*, 391.

(62) BAUDOT, DELANDE. — *La culture des bacilles tuberculeux et ses incidences chimiques d'après notre expérience personnelle.* Toulouse Médical, 1954, p. 125.

(63) P. STRUB. — *La valeur actuelle des différents procédés pour la recherche du bacille de Koch en tuberculose pulmonaire.* Thèse, Paris, 1954.

(64) A. MAURER. — *Interprétation tendancieuse de certains résultats approximatifs dans le traitement de la tuberculose pulmonaire.* Rev. Tub., 1954, *18*, 1.050.

(65) P.-E. DAVY et J.-C. LEVADITI. — *Rôle de la centrifugation dans la recherche du bacille de Koch par les procédés d'homogénéisation.* Ann. Inst. Past., 1938, *61*, 300.